

	Fiche compte-rendu semestriel d'activité		Date : 09/07/2007
			Réf.: ANR/
			Nombre de pages : 4

Tâches	2007	2008		2009	2010	Commentaires
		S1	S2			
QTL analysis on PB260 x MDF180 (French Guiana pop.)		⌘	⌘	Δ		Détection de QTL sur MDF180 réalisée sur carte SSR préliminaire ; à finaliser sur carte SSR + AFLP
DNA extraction and paternity testing on new progenies			⌘	▲		Trois nouvelles descendance pour carto. : descendants supplémentaires de PB260 x FX2784 de PEM ; desc. sup. de PB260 x MDF180 de PMB ; nouveau croisement (Sensible x Résistant = WxR) de PMB dont le choix a été arrêté : R = FDR5597 ; Envoi de feuilles à Montpellier, extractions ADN et tests de paternité réalisés sur 539 descendants dont 171 WxFDR5597 certifiés légitimes par SSR ; à finaliser au 1 ^{er} semestre 2009.
SSR mapping on PB260 x MDF180 (PMB pop.) and on one WxR progeny				Δ		100-200 SSR à génotyper par descendance ; légitimité de 84 descendants confirmée par SSR
QTL analysis on 3 progenies				Δ	Δ	PB260xRO38 ; PB260 x MDF180 (PMB pop.) ; WxFDR5597
(Fine)-mapping of SSR on PB260 x FX2784 (PEM pop.)			⌘	Δ		Génotypage de 12 marqueurs SSR au lieu de 8, réalisé plus tôt que prévu sur 284 descendants légitimes ; évaluation complémentaire de la résistance au champ en cours (PEM)

Cirad + Michelin (Montpellier) : sous projet 3 (Gènes candidats)

EST-SSH libraries related to the RO38 resistance: DNA sequencing and data mining	(⌘)	⌘	⌘	▲		9216 clones d'EST de 6 banques SSH produits et séquencés (V. Pujade-Renaud, Cirad, Montpellier) ; data mining initié, à affiner
EST-SSH libraries related to the RO38 resistance: expression analysis		⌘	⌘	Δ		Réalisation de macro-arrays en cours ; maîtrise de la technique et réalisation d'un premier lot de membranes et d'hybridations : réalisé (stage de M2 de M. Déon)
EST-SSH libraries related to the MDF180 resistance: data mining		⌘	⌘	▲		6959 séquences d'EST de 4 banques SSH fournies par l' UESC (D. Garcia, Brésil) ; data mining initié, à affiner
EST-SSH libraries related to the MDF180 resistance: results of expression analyses				Δ		Etudes d'expressions réalisées à l' UESC par D. Garcia sur fonds propres. Les gènes candidats identifiés seront mis à disposition du projet.

Cirad + Michelin (Montpellier) : sous projet 2 (Développement de marqueurs)

Search for SSR sequences in ESTs; test for polymorphic PCR markers		⌘	×	▲		Analyse d'EST d'hévéa disponibles dans EMBL réalisée ; tests de polymorphisme sur 2009
Search for polymorphic markers in candidate ESTs				Δ	Δ	Recherche de SSR dans les EST ou dans les BAC-ends (BES) et de SNP
Map integration of candidate ESTs					Δ	

Cirad (Kourou, Guyane) :

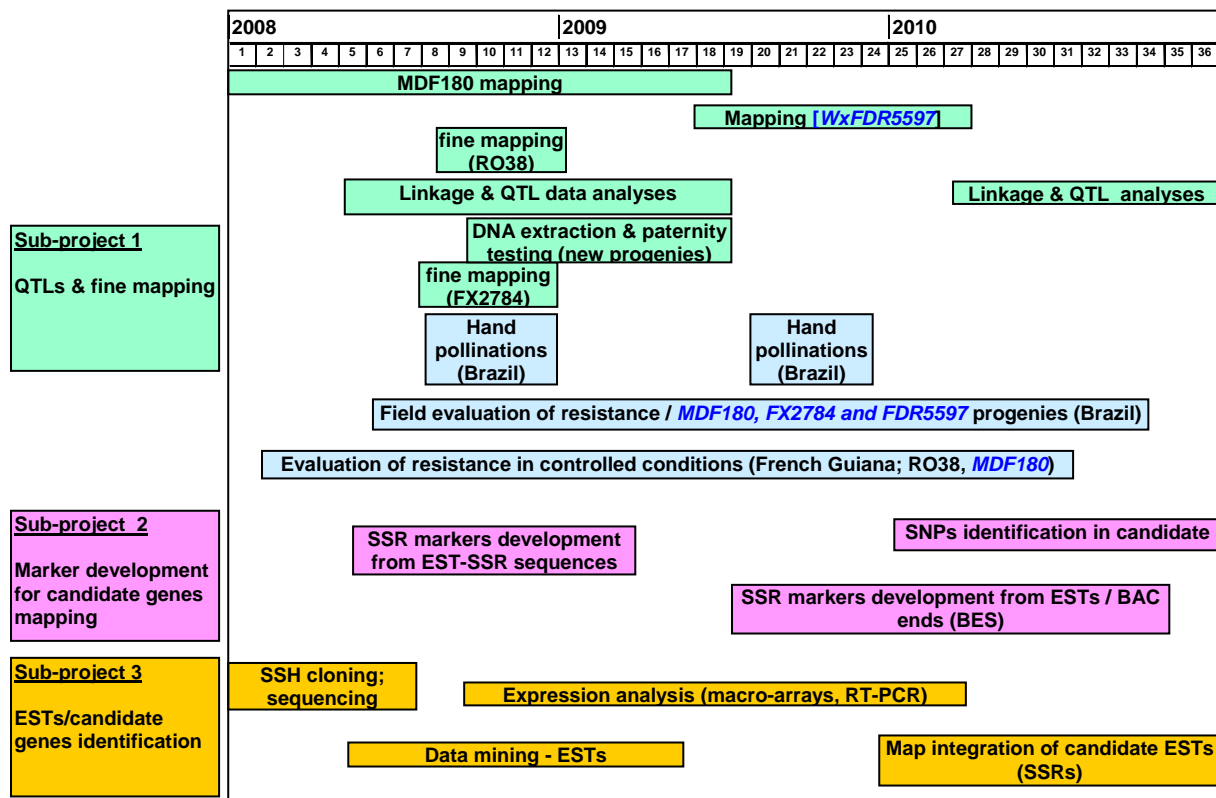
	Fiche compte-rendu semestriel d'activité		Date : 09/07/2007
			Réf.: ANR/
			Nombre de pages : 4

Tâches	2007	2008		2009	2010	Commentaires	
		S1	S2				
Resistance evaluation of the 300 additional PB260xRO38			✖	Δ	▲	Evaluation de la Résistance (R) au champ des 118 F1 PB260xFX2784 réalisée antérieurement ; tests R en conditions contrôlées sur ces descendants remplacés par tests sur 196 F1 PB260xMDF180, en cours à Kourou , à l'aide d'une souche équatorienne de <i>M. ulei</i> => tests sur PB260xRO38 reportés en années 2-3.	
Resistance evaluation of the 118 F1 PB260xFX2784	(P)				✖		
<i>Resistance evaluation of 196 F1 PB260xMDF180</i>		▲	▲	▲			
Michelin (Plantation Edouard Michelin - PEM, Plantation Michelin de Bahia - PMB, Brésil) :							
Crosses by hand pollinations, Brazil			P	Δ			
Filed resistance evaluation of 3 progenies: PB260xFX2784 (PEM), PB260xMDF180 and Wx FDR5597 (PMB)	(P)	P	P	Δ	Δ	Voir ci-dessus "Paternity testing"	
Δ	Prévu	▲	Reprévu	✖	Abandonné	P	Réalisé

Indiquer les dates des réunions des projets :

* Ce tableau décrit les principales taches et livrables du projet qui ont été définis lors du démarrage du projet.

Updated work plan (December 2008)



	Fiche compte-rendu semestriel d'activité		Date : 09/07/2007
			Réf.: ANR/
			Nombre de pages : 4

C. Retombées cumulées sur la durée du projet

Cette section rassemble des éléments cumulés qui seront suivis tout au long de l'avancée du projet et repris dans son bilan. Ils permettent d'apprécier l'impact du programme à différents niveaux. Cette section est constituée d'un tableau des publications¹, et d'une liste de résultats éventuellement plus qualitatifs.

Nombre de publications et de communications cumulées sur la durée du projet.

Faire la séparation des actions impliquant un seul partenaire et celles résultant d'un travail en commun (« multipartenaires »)

	International		France		Actions de diffusion		
	Articles acceptés dans des revues à comité de lecture	Communications Internationales	Articles France	Communications France	Articles vulgarisation	Conférences vulgarisation	Autres
monopartenaires							Déon Marine (2008) <i>Rapport de stage de Master M2 Professionnel, Univ. Montpellier II & Montpellier SupAgro</i> , 39p.
							Le Guen Vincent (2008) <i>Thèse de doctorat, Univ. Montpellier II & Montpellier SupAgro</i> , 186p.
multipartenaires				Seguin et al. (2008) Présentation du projet GENESALB. Séminaire Génoplante, Arles 2008: Poster			

Autres retombées (voir en particulier celles annoncées dans l'annexe technique) :
Cette liste inventorie les brevets nationaux et internationaux, licences, et autres éléments de propriété intellectuelle consécutifs au projet, du savoir faire, des retombées diverses. . Elle en précise les partenariats éventuels.

Nature	Commentaire
Carte de 177 SSR de PB260xMDF180	Destiné au domaine public
Deux QTL majeurs identifiés chez MDF180 en Guyane	Destiné au domaine public
9120 séquences d'ESTs exprimés en relation avec la résistance/sensibilité (SSH)	Destiné au domaine public

¹ La date de référence est la date de fourniture du rapport.

	Fiche compte-rendu semestriel d'activité		Date : 09/07/2007
			Réf.: ANR/
			Nombre de pages : 4

D. Faits marquants du semestre écoulé (principaux résultats)

Réunion du Comité de Pilotage (CP) : en raison des agendas chargés des partenaires, il n'a pas été possible de réunir le Comité de Pilotage de GENESALB à la fin 2008. Il a été décidé de reporter cette réunion à début mars 2009 au Brésil, à l'occasion de la tenue du comité technique d'un autre projet Cirad –Michelin (CMB), où seront présents la majorité des participants de GENESALB y compris les collègues brésiliens de Michelin.

1- Choix de nouvelles descendances pour la cartographie/QTL (sous-projet 1):

Un point important, conditionnant la suite du projet et au-delà, était le choix de nouvelles descendances en ségrégation pour la détection de QTL de résistance au SALB. Trois nouvelles descendances, i.e. nouveaux individus, de croisements analysés antérieurement en cartographie/QTL avaient déjà été sélectionnées en début de projet ou au 1^{er} semestre (PB260 x FX2784 à PEM, PB260 x MDF180 à PMB et PB260 x RO38 - "Vietnam" en Guyane). Il s'agissait d'identifier une 4^{ème} descendance issue d'un nouveau croisement et représentant potentiellement une source de résistance différente celles caractérisées précédemment.

Plusieurs descendances, disponibles en collection sur la plantation PMB de Michelin au Brésil, avaient été retenues comme candidates suivant 2 critères principaux : nombre suffisant en collection, sur la Plantation Michelin de Bahia (PMB), de descendants F1, issus de croisements [Wickham = Sensible] x Résistant (WxR) ; géniteur résistant d'origine génétique diversifiée et de bonne valeur agronomique, tant pour la résistance au SALB que pour la production en latex et la croissance. Nous avons ainsi retenu 7 géniteurs candidats : PFB5, CDC312, FDR5211, FDR5788, FDR5597, FDR5240 et FDR4773. Toutes les descendances avaient fait l'objet de notation de la résistance sur tous les arbres et sur plusieurs années à PMB. Le choix entre les croisements candidats s'est fait d'après l'analyse des distributions (histogrammes) des notations de résistances dans les descendances de chaque croisement. Nous avons retenu le croisement pour lequel l'évaluation de la résistance avait été le plus précis, c'est-à-dire sur le plus grand nombre d'années (2002-2007), et présentant une bonne ségrégation des 2 paramètres de résistance mesurés, le Type de Réaction (TR) et la Densité de Stromas (DS) : il s'agit de W x FDR5597 dont deux descendances F1, PB235 x FDR5597 et IRCA130 x FDR5597 ont été évaluées depuis 2002. Au total, en cumulant toutes les descendances W x FDR5597, 760 descendants de géniteur sont disponibles à PMB. Pour GENESALB, nous avons choisi de réaliser la cartographie / QTL sur une population de 372 descendants F1, issus des 2 croisements PB235 x FDR5597 (259 F1) et IRCA130 x FDR5597 (123 F1).

	Fiche compte-rendu semestriel d'activité		Date : 09/07/2007
			Réf.: ANR/
			Nombre de pages : 4

2- Certification de la légitimité des descendance (sous projet 1):

La légitimité des nouvelles descendance a été contrôlée par test de paternité par marqueurs SSR (voir ci-dessous). La descendance PB260 x RO38 - « Vietnam » en Guyane avait été confirmée légitime antérieurement au projet. Pour les trois autres descendance, issues de FX2784 à PEM et de MDF180 et FDR5597 à PMB, la légitimité a été testée pour tout ou partie des descendants au cours de ce second semestre. La conformité a été contrôlée par rapport aux génotypes parentaux des arbres ayant servi, à PEM, à la réalisation des croisements par pollinisation manuelle. Toutes ces descendance sont conformes avec un très faible nombre d'individus illégitimes (0 à 2%). Ce résultat permet donc la poursuite du projet suivant le programme prévu.

3- Analyse d'expression par macro-arrays (sous projet 2) :

L'approche gène candidat a été initiée par la réalisation de banques de type SSH (Subtractive Suppressive Hybridization) de gènes différentiellement exprimés entre clones d'hévéa sensible (PB260) et résistant (RO38) au cours de l'interaction avec le champignon *Microcyclus ulei*. L'analyse de ces banques par macroarrays (puces à ADN) devrait permettre d'identifier les gènes candidats les plus prometteurs. Au cours de ce second semestre, le stage de Master de Marine Déon a permis de mettre en place toutes les étapes de processus d'analyse par macroarrays. Des filtres ont été réalisés pour 4 banques SSH (soit 3700 EST amplifiées par PCR, concentrées et spotées sur membrane). L'analyse préliminaire des premiers résultats d'hybridation a permis de mettre en évidence les gènes les plus fortement régulés par l'inoculation chez le clone sensible. La poursuite de ces analyses permettra d'étudier le différentiel d'expression entre sensible et résistant afin d'identifier les meilleurs candidats associés à la tolérance à *M. ulei*.

E. Description des travaux effectués et résultats obtenus pendant la période concernée. Conformité de l'avancement des travaux avec le plan initialement prévu. Prévision de travaux pour la (les) prochaine(s) période(s). Eventuellement, difficultés rencontrées et solutions de remplacement envisagées (15 lignes maximum) ex : impasse technique, abandon d'un sous traitant, maîtrise des délais, maîtrise des budgets. Faut-il revoir le contenu du projet ? Faut-il revoir le calendrier du projet ?

- 1- Génotypage AFLP (en cours) de la descendance PB260xMDF180 de Guyane. Les problèmes techniques rencontrés au 1er semestre ont été surmontés. Vingt-quatre couples d'amorces AFLP EcoRI/MseI, utilisés antérieurement avec succès sur des

	Fiche compte-rendu semestriel d'activité		Date : 09/07/2007
			Réf.: ANR/
			Nombre de pages : 4

descendances issues de PB260, ont été sélectionnées et testées sur 59 des 350 descendants de ce croisement. L'analyse des gels à l'aide du logiciel Quantar Pro a confirmé le nombre espéré de 200 marqueurs AFLP qui pourront être intégrés à la carte au final.

- 2- Envoi de feuilles (1 feuille par descendant, 3 feuilles pour chaque parent) du Brésil à Montpellier (09/08), extraction d'ADN et tests de paternité / légitimité par SSR. L'extraction d'ADN a été réalisée à l'aide d'un protocole utilisant un broyeur à billes MM300 (Qiagen) :
 - PB260 x FX2784 de PEM : 294 / 294 échantillons – descendants reçus, extraits et testés sur 12 marqueurs SSR : **284 légitimes (98%)**
 - PB260 x MDF180 de PMB : 84 / 135 échantillons – descendants reçus, extraits et testés sur 15 marqueurs SSR : **84 légitimes (100 %)**
 - PB235 x FDR5597 et IRCA130 x FDR5597 de PMB : 197 / 348 échantillons – descendants reçus, 171 extraits et testés sur 15 marqueurs SSR : **170 légitimes (99 %)**
- 3- Poursuite de l'analyse bioinformatique / « data mining » (X. Argout) des EST issues des banques SSH PB314 vs. MDF180 (D. Garcia) et PB260 vs RO38 (V. Pujade-Renaud)
- 4- Préparation et hybridation des membranes macro-arrays pour analyses d'expression des EST-SSH de « RO38 » (voir ci-dessus Partie D) ; résultats du stage de Master2 de Marine Déon (soutenance le 9 Octobre 2008 à Montpellier).
- 5- Compilation et analyse des données préliminaires de notations de résistances sur des descendances de 6 géniteurs résistants pour le choix des nouvelles populations de cartographie (voir ci-dessus Partie D).
- 6- Evaluations complémentaires de la résistance au champ des descendances de cartographie au Brésil : tous les arbres seront réévalués à l'aide des 2 paramètres TR et DS lors de 12 passages d'observation sur 2 ans. Sur PEM, les arbres ont été recépés en Octobre 2008 et les premiers passages de notations ont débuté dès la reprise de la croissance et la refoliation ; sur PMB, le recepage a pu être réalisé en décembre, les notations débuteront début mars 2009.
- 7- Evaluation complémentaire de la résistance de la descendance PB260 x MDF180 en conditions contrôlées en Guyane : suite au comité de pilotage de juin 2008, il avait été décidé de tester la résistance de ce croisement par inoculation d'une 4^{ème} souche isolée de *M. ulei*, d'origine guyanaise et d'agressivité comparable à la souche guyanaise CB101 testée antérieurement. Il n'y avait malheureusement pas de souches guyanaises disponibles dans la collection de Guyane, pour lesquelles le niveau de résistance de MDF180 soit connu. Afin de lancer les inoculations sur la descendance dès 2008, conformément au calendrier prévu, nous avons choisi une souche équatorienne vis-à-vis de laquelle la résistance de MDF180 était connue. Au cours de ce second semestre, 100 des 196 descendants ont été inoculés une première fois et évalués pour la résistance à cette souche, à l'aide de paramètres TR et Diamètre des Lésions (DIL). Ces inoculations seront répétées et complétées sur la totalité des 196 descendants au 1^{er} semestre 2009.

- 8- Création de nouvelles descendances, campagne de pollinisation manuelle 2008 (PEM) : des croisements ont été réalisés par pollinisation contrôlée (manuelle) en vue de l'introgression de facteurs de résistance dans un fonds génétique Wickham, haut producteur. Ce matériel pourra servir à la poursuite de la cartographie/QTL à l'issue du présent projet ainsi qu'à la sélection classique ou assistée par marqueurs pour une sortie variétale. Le clone d'hévéa PFB5 présente un type de résistance intéressant, du type de MDF180, mais cette résistance ne semble pas ségréger dans ses descendance de première génération (F1), suggérant la présence de facteurs de résistance à l'état homozygote. Pour permettre dans l'après GENESALB, l'analyse génétique de cette source de résistance, il a été choisi de réaliser des croisements de 2^{ème} génération par « rétro-croisement » sur un clone sensible Wickham, certains des descendants F1 étant entrés en floraison : 6146 pollinisations manuelles du croisement RRIM600 x [IRCA109 x PFB5] ont été réalisées à PEM en Août 2008. Deux individus F1 IRCA109 x PFB5 ont été utilisés comme géniteurs mâles, avec environ 3000 pollinisations réalisées pour chacun d'eux.

Il n'y a pas eu de problèmes nécessitant de modifier de façon importante le contenu ou le calendrier du projet.

1- Mouvements de personnel

Un seul événement majeur est intervenu au cours de ce second semestre : il s'agit de la démission au 1^{er} Septembre 2008, pour convenances personnelles, de Christelle Weber technicienne de laboratoire du Cirad à l'UMR-dap. Dans la mesure où C. Weber avait réalisé son temps de participation 2008 dès le 1^{er} semestre (0,4 ETP), sa démission n'a pas eu d'impact négatif sur la réalisation des activités de GENESALB prévues en 2008. Les démarches ont été entreprises auprès de la direction du Cirad pour demander son remplacement et permettre ainsi la réalisation des 0,3 ETP par an de participation de C. Weber, tels qu'affichés dans le projet initial en 2009 et 2010.

2- Modifications au projet proposées

Il n'y a pas de modifications à apporter au projet autres que celles effectuées à la fin du premier semestre (voir 1^{er} rapport semestriel).

F. Etat financier et ressources humaines

Bref descriptif de l'état de consommation des crédits

	Crédits consommés (en %)	Commentaire éventuel
Main d'œuvre (tous statuts confondus)	31	

	Fiche compte-rendu semestriel d'activité		Date : 09/07/2007
			Réf.: ANR/
			Nombre de pages : 4

Equipement	-	Pas d'achat d'équipement prévu dans le projet
Mission	1	Déplacements Arles 2008 ; 2 missions Brésil prévues en 2009
Fonctionnement/prestations	24 / 33	33% prestations = 29,4 k€ sur 90 k€ de séquençage (fin ^{nt} Michelin), suivant prévisionnel

En cas de variation supérieure à 30%, d'une ligne par rapport au budget prévisionnel, en donner les éléments justificatifs.

Bilan des CDD cumulés depuis le début du projet

	nombre de personnes employées en CDD sur le projet et financées par l'ANR	
	nombre	h-mois cumulés sur tous les partenaires depuis le début du projet
Doctorants	-	
Post-docs	-	
Ingénieur en CDD	-	
Stagiaires	1	7-mois (Mlle Marine Déon, Master 2)
Technicien en CDD	1	9-mois (Mme Sandra Espéout-Fois, recrutée par Michelin à compter du 01/04/08)

Commentaire général à l'appréciation du coordinateur, sur l'état d'avancement du projet, les interactions entre les différents partenaires...

Le retard pris dans la réalisation de la cartographie du premier croisement est dû aux problèmes techniques rencontrés au 1^{er} semestre. Ces problèmes ont été résolus et cette opération a repris son cours normal.

Du retard, a également été pris dans la mise en route des opérations de cartographie et d'évaluations phénotypiques des nouvelles descendances car le choix de ces descendances n'a pu être arrêté que tardivement (Août 2008). Ce choix conditionnant la suite des travaux de recherches sur plusieurs années, dans le cadre de GENESALB et au-delà, il nous a paru nécessaire de prendre le temps d'une analyse approfondie des données disponibles.

Les autres opérations se déroulent suivant le calendrier prévu. La coordination du projet est assurée et facilitée par des échanges très réguliers, plusieurs fois par mois, entre les responsables d'équipe des 2 partenaires Cirad (M. Seguin) et Michelin (F. Granet) ainsi que plus directement entre les participants présents sur les différents sites (Montpellier, Clermont-Ferrand, Guyane, Brésil/PMB et Brésil/PEM).

Fiche compte- rendu semestriel d'activité

Date : 09/07/2007

Réf.: ANR/

Nombre de pages : 4

Les résultats préliminaires obtenus à l'issue de cette première année (détection de QTL, maîtrise des macro-arrays, descendance certifiées légitimes) même s'il sont un peu moins avancés qu'espérés, sont très encourageant pour la suite du projet.

Facultatif : commentaire(s) de partenaire(s)...

Facultatif : question(s) posée(s) à l'ANR...